総 説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 69, No. 10, pp. 1301~1308, 1995]

トランスグルタミナーゼの有用性研究とその実用化†

(1995 年度農芸化学技術賞受賞)

本木正雄, 添田孝彦, 安藤裕康*, 松浦 明*

(味の素㈱食品総合研究所, *天野製薬㈱中央研究所)

1. はじめに

生体組織から抽出分離されたタンパク質を食品加工などに素材として利用する場合, 一般的にジスルフィド結合, 静電的相互作用, 疎水性相互作用及び水素結合などの形成を種々の手段で制御して加工目的を達する事が多い。しかし, そうした従来の手法だけでは食品素材ともなる生体組織そのものがもつ物性を再構成して近似させる事は困難である。著者らは脱脂大豆から抽出したタンパクを粒状, 組織状, 繊維状に加工して肉様素材にファブリケートする研究に没頭した事があるが, どうしてもしなやかで強靱な, そして加熱収縮するような肉様物性を再構成させる事は困難であった。そこで食肉物性を多面的に調査・解析してみたところ, Whitaker が天然タンパク質, 特に結合組織には多くの共有結合性の架橋結合が存在し, それが生体組織の柔軟で強靱な独特の構造形成の大きな要因になっており, それを意図的に形成させて利用できれば生体外でそのような物性を創出出来るのではないかと仮説を提唱していることが分かった⁽¹⁾。しかし, 一般的にデスモンシン等の架橋結合を有するタンパク質は水に非溶解性であり, 先端のタンパク質化学の研究対象から敬遠されがちで厄介なものであったが, 実際の食品における多彩な食感発現には重要な役割を担っていると確信し研究をすすめた。その架橋結合の中で, 特に ϵ -(γ -Glu)Lys 結合は幸いにも翻訳後にトランスグルタミナーゼ(以下, TG)という酵素による修飾反応で生成さ

れることから, その反応制御による意図的な食感創造が可能と考えた。すなわち, この TG はタンパク質中の Gln 残基の γ -カルボキシアミド基と一級アミン間でのアシル転移反応を触媒する酵素である (Fig.1 A) が, Lys 残基の ϵ -アミノ基も一級アミンとして作用するのでタンパク質分子内/間に橋かけ構造を形成させる (Fig.1 B)。従ってこの酵素を分離し, 生体外で食品タンパク質を基質に架橋結合を意図的に形成できるか, また食品の物性制御が容易にできるかを確認する事にした。まず入手が容易な動物起源の TG でその確認および食品加工上の有用性を見極め, さらに TG の量産化とその利用開発を中心とした研究を行ない実用化を模索した。以下, その概要を述べる。

2. TG の有用性研究^(2~14)

比活性が高く, 比較的著量存在する新鮮なモルモット肝臓を用い, TG を大量に抽出分離し, 5~10%濃度の大豆タンパク質をはじめ各種食品タンパク質溶液に 1 unit/mg タンパク質程度の TG を添加し 37°C でインキュベートすると, 系全体が数分でゲル化する現象

Fig.1. Acyl-transfer Reaction Catalyzed by TG.

A : incorporation of a primary amine into a protein ; B : cross - linking between protein molecules through formation of ϵ -(γ -glutamyl) lysine bond ; C : deamidation of a glutaminy side chain in a protein.

† Feasibility Studies of Transglutaminase and its Practical Application to Processed Foods.

Masao MOTOKI, Takahiko SOEDA, Hiroyasu ANDO*, and Akira MATSUURA* (: Food Research & Development Laboratories, Ajinomoto Co., Inc., Kawasaki-ku Kawasaki 210, *Central Research Laboratories, Amano Pharmaceutical Co.Ltd., Nishikasugai-gun Aichi, 481)

を見い出すことが出来た。このゲルは SDS, 尿素, β -メルカプトエタノール等のタンパク質変性剤処理でも可溶化されないことから共有結合状に高分子化していることを示すものであった。さらにそのゲルに加熱変性処理を施すと疎水性相互作用などが相乗的に作用し, より強靱な構造性を示した。またこの非加熱状態でのゲル形成性は接着, 膜形成, 繊維形成などにも応用でき, 加熱に対してその強度が減衰することのない耐性を有することがわかった。そして実食品系で重要な糖質, 塩類などの各種食品機能成分が共存しても, ゲル形成性は阻害されないものであった。さらに人工的に O/W 型に予め乳化したタンパク質含有溶液, また牛乳及び豆乳など天然タイプの乳化溶液も基質濃度を調整すれば容易にゲル化することを明らかにした。これはタンパク質分解型の凝乳酵素であるキモシンとは全くメカニズムが異なる新しいタイプの凝乳酵素とも言えるものであった。そして同種タンパク質間の架橋高分子化反応を抑制する工夫が必要であるが, 性質の全く異なる 2 種以上のタンパク質間でハイブリッド化することにより, それぞれのタンパク質の性質を併せ持つ素材の創出が可能であることを示した。また TG でタンパク質ゲルを形成させる時に, 目的とする酵素をそのゲルの格子に包括させ固定化する事も可能であった。

3. トランスグルタミナーゼ産生菌の探索

上述のように食品加工上有用性が高いと判断されたが, 実用化には TG の量産化が課題となった。TG は哺乳類のほとんど全ての組織, および鳥類, そして最近では魚類, 植物にも広範に存在することが知られている。特に魚類の内在性 TG は魚加工品, 例えば蒲鉾の“足”といわれる弾力のある食感⁽¹⁵⁾あるいは鱈の干物の独特の食感形成⁽¹⁶⁾に関わっているとの発表もある。しかし, 酵素の量産化を目指す場合, それらの原料から商業的に, それも食品工業用に大量に抽出することは

困難と考えられた。また伊倉らのモルモット肝 TG を大腸菌に組み込んで発現させる遺伝子工学的製法⁽¹⁷⁾は画期的ではあったが, 社会的受容性等の課題から早期の実用化は当面無理と判断せざるを得なかった。そこで, その当時存在が全く報告されていなかった微生物界から TG を見い出すことができれば量産化しやすいと判断して, 各地の土壌から伝統的な手法で生産菌を探索することに注力した。実際, 約 5,000 株を分離し, ハイドロキサメート生成活性, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による高分子化活性, さらに試験管倒置による基質タンパク質のゲル化活性を指標に丹念にアッセイしたところ, ある放線菌株の培養上清に強い TG 活性 (2.0 units/ml 培養液) を見出した (Table 1)⁽¹⁸⁾。この菌は細胞壁の化学組成, 形態学的観察, 各種培地での生育試験, 及び生理学的試験などの結果より, *Streptovorticillium mobaraense* の variant と同定された⁽¹⁹⁾。これは微生物界で世界に先駆けて見つかった最初の株で, 偶然非常に強い TG 産生能があるものであった。また他の同種の保存菌株を調べたところ, *Streptovorticillium* sp. である数株に弱いながらも酵素活性が認められた。新たに見い出された菌株は TG を菌体外に分泌することがわかり, 培養上清から 42% の収率で TG を単離精製でき, 最近この菌体外への分泌性という生産性の高い特長を生かした実生産システムを構築することができた。

4. 微生物 TG (Microbial Transglutaminase ; MTG) の特性

(a) 酵素学的性質⁽¹⁸⁾: 精製した MTG の作用至適 pH は中性付近であるが, pH 4, あるいは pH 9 でも相対残存活性は 30% 以上を示し, 且つ pH 5~9 の広範囲で安定であった。また温度に対する影響を調べると至適温度は 45~55°C で, 安定性も 40°C までは活性は完全に維持され, 50°C, 10 分処理でも 74% の活性が残存し耐熱性が比較的高く, 取扱いやすい酵素であった (Fig. 2)⁽³⁹⁾。哺乳類起源の各種 TG と異なる点は, 分子量が約 38,000 と小さく (哺乳類 TG は 7~8 万位のものが多い), また等電点がアルカリ側にあり, そして Ca^{2+} 非依存的に活性が発現されること等である。特に, 従来の TG が Ca^{2+} 依存性と定義されていたので, その差異が特徴的であった。

(b) MTG の構造⁽²⁰⁾: MTG は SDS-PAGE による

Table 1. TG Activity of the Culture Broth Solution.

Strain	TG Activity (U/ml)
<i>Streptovorticillium</i> sp.*	2.00
<i>Streptovorticillium mobaraense</i> IFO** 13829	0.35
<i>Streptovorticillium griseocarneum</i> IFO 12776	0.28
<i>Streptovorticillium cinnamomeum</i> IFO 12852	0.50

* a variant of *Streptovorticillium mobaraense*

** IFO : Institute of Fermentation in Osaka

Fig.2. Effects of pH and Temperature on Purified MTG Activity.

分子量分析, アミノ酸分析により約 320 残基前後と推定されたが, 更にタンパク質化学的にアミノ酸配列分析を行ったところ, N末端は Asp, C末端は Pro となり, 分子内に Cys 残基を遊離型でわずか 1 個(Cys⁶⁴)存在する, 合計 331 残基の単量体であることがわかった(Fig.3)⁽²⁰⁾. このチオール基は酵素活性の発現に必須であり, チオール型酵素を示唆するものであった。また 2 箇所(Asn²⁸², Asn²⁹⁷)に糖鎖結合の信号配列を有しているが, どちらにも糖鎖は結合していなかった。決定した配列から計算される分子量は 37,842 であり, SDS-PAGE により推定された値とよく近似していた。従来の哺乳類 TG とは一次構造上の相同性は極めて低い, 活性部位のチオール基近傍は疎水性が高く, α -

ヘリックスから β -シートにつながるターン部分に存在し, 哺乳類 TG 中の活性チオール基近傍の立体的環境に類似していることが CD スペクトル測定及びハイドロパシー解析から推測された。これは同一の酵素活性を発現するには一次構造上の配列の相同性よりも活性部位の立体的空間環境の方が重要であることを示唆するものであった。なお, 我々はこの菌体の染色体から遺伝子のクローニングを行い, 得られた塩基配列の解析からその一次構造はタンパク質化学的に決定したものと完全に一致していた⁽¹⁹⁾。また, この一次構造情報から大腸菌や酵母の使用コドンを検討にいてデザインし MTG 遺伝子を化学全合成し, それを大腸菌に組み込み, その発現に成功する事が出来た^(21,22)。

```

DSDDRVTPPAEPLDRMPDPYRPSYGRAETVNNYIRKWQQVYSHRDGRKQ50
QMTEEQREWLSYG64CVGVTWVNSGQYPTNRLAFASFDEDRFKNELKNGRPR100
SGETRAEFEGRVAKESFDEEKGQFQRRAREVASVMNRALENAHDESAYLDNL150
KKELANGNDALRNEDARSPFYSLRNTPSFKERNGGNHDP SRMKAVIY200SK
HFWSGQDRSSADK RKYGD PDAFRPAPGTGLVDM SRDRI PRSPTSPGE250G
FVNFDYGWFGAQTEADADKT V WTHGNH THAPNGSLGAMHVYESKFRNWSE300
GYSDFDRGAYVITFIPKSWNTAPDKVKQGW331P

```

Fig.3. Whole Amino Acid Sequence of MTG.

5. MTG の食品タンパク質基質への反応性^(23~32)

MTG を 1~10% のタンパク質溶液に作用させ、ゲル化するかどうかを試験管倒置法で判定すると、Fig. 4 のようにモルモット肝 TG で得られた結果と同様であったが、特異性の高い哺乳類由来の TG に比べて基質となるタンパク質の範囲の広いことがわかった。また、基質になりにくいアルブミン類でも DTT で還元処理すると基質化できるので、変性タンパク質として利用することの多い食品素材への適用範囲は広いと考えられた。また、MTG で生成したゲルは加熱操作 (100°C, 15 分処理) するとゲル強度が飛躍的に増大したり、加熱溶解性のゲルを形成するゼラチンを MTG 処理すると加熱非溶解性ゲルに変わったり、通常はゲル化しないカゼインなどのタンパク質を非加熱でゲル化させ得るなどの特長を確認できた。

6. 異種タンパク質間架橋、およびアミノ酸、ペプチドの導入

本酵素の第一の有用性は酵素を添加するだけでタンパク質の特性を変化させる架橋反応であるが、Fig. 1 A にあるように TG はタンパク質中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基への一級アミンの取り込み反応を基本としている。タンパク質、ペプチド、アミノ酸中のアミノ基も一級アミンと考えられるので基本的には基質タンパク質の中に取り込むことが出来る筈である。しかし、実際はその反応だけを進行させるにはアシル化剤で同種間の架橋反応を一旦止める操作が必要である。このように処理してから、異種タンパク質を加えて TG 反応を進行させると基質タンパク質にそれらを導入することが可能であった。実際、オボムシンという糖タンパク質をカゼイン等とコンジュゲートし乳化性を向上⁽³³⁾ させたり、カゼイン/ゼラチンハイブリッドでは酸性での溶解性が劇的に改善される⁽³⁴⁾ などの例を確認した。また、モルモット肝 TG で伊倉らが最初に成功した^(35,36) のであるが、MTG でも食品基質タンパク質にアミノ酸を導入することも触媒できる。しかし、実際は Lys だけが反応性の高い一級アミンの ϵ -アミノ基を有しているため、エステル化などの誘導体化は不要でそのまま導入できるが、その他のアミノ酸は α 位のアミノ基が反応しづらいためにエステル化などで求核性を上げる処理が、その導入のために必要であった。またペプチドではリジンを含有するものであ

れば、そのまま導入できることがわかった。一例を示すと、リジルジペプチドの導入実験では我々の MTG はモルモット肝 TG よりも導入率が高いとの結果を得ている⁽³⁷⁾。また、ペプチドの場合基質タンパク質の Lys 残基が反応しやすい環境にあれば逆にグルタミン含有ペプチドをコンジュゲートできる。このようにブロックに用いるシトラコニル化などの可逆的なアシル化剤は TG 反応後、酸性にするだけで簡単に除去できるのでタンパク質に異種タンパク、ペプチド、アミノ酸を取り込ませ、種々の機能 (物性、生理機能など) を付与した新素材創出などが可能となり新たな応用領域の展開が期待されている。

7. 食品加工への応用^(38~45)

量産化に成功した MTG はチオール型酵素のため酸化で失活しやすいので、先ずそれを防止し、長期流通に耐えうる製剤化技術を確認した。次に、その酵素製剤を用いて実際の食品加工への応用研究を展開し、幅広く応用可能であることを示した。すなわち、タンパク質へのゲル形成性付与という基本機能を有する MTG の特長としては、①タンパク質のゲル形成性をさらに向上させる (例、大豆タンパク質など)、②ゲル形成性を有しないタンパク質にそれを付与できる (例、カゼインネート)、③未加熱でゲル化できる (各種タンパク質)、④ゲルに耐熱性、耐水性、耐酸性を付与できる (例、ゼラチンなど)、⑤新規なゲルテクスチャー (クラゲ様、いくら様) を創出できる、などを列挙することができる。そこで各分野での用途の一端を例示する。

(a) 大豆・小麦加工分野 ①豆腐^(46,55)：丸大豆から調製した豆乳を 65°C に冷却後豆乳 1 kg 当たり GDL 3 g と MTG 2 units/gP (1 g タンパク質当たり 2 ユニット) を加え型枠に充填し 1 分間蒸し加熱を行った。加熱終了後流水中で 3 時間晒し、1.5 cm 角に成形後、レトルト用パウチに充填した。この充填物を 110°C で F0 値が 4 になるまで加熱しレトルト豆腐を得た。この MTG 処理豆腐はなめらかでレトルト処理前の食感に近いものであった。②麺⁽⁴⁷⁾：小麦粉 2 kg, 食塩 40 g, 水 680 g をベースにして調製して得た生うどんを 15 分間ゆでた後、1 リットルあたり MTG を 4000 units 溶解した酵素水溶液に浸漬処理し再加熱し製品化したものはコシのある硬さが保持され (すなわちゆで伸びが防止され)、脆さが改善される効果が認められた。

(b) 魚肉加工分野 ①冷凍魚肉すり身⁽⁴⁸⁾：スケトウダ

Fig.4. Gelation of Several Food Protein Solutions by MTG.

The proteins studied were: α_{s1} -casein(5%, w/v), soybean 11 S globulin(10%, w/v), C, carp myosin(1.5%, w/v) and R, rabbit myosin(1.5%, w/v). — : MTG was not added to the protein solution; + : MTG was added to it the ratio 0.02 units/mg substrate protein. The MTG-reactions were performed at 37°C for 4 hrs.

ラを採肉，水晒し，脱水して得た 100 部にソルビトール 8 部，MTG(比活性 1 unit/mg)0.02 部，リン酸塩 0.2 部混合して生すり身を得た。この蒲鉾形成能を評価すると対照に比べて弾力性が大幅に向上した。

②蒲鉾⁽⁴⁹⁾：洋上魚肉すり身 64%，食塩 2%，氷水 26%，澱粉 3%，その他調味料を原料とし MTG を 0.5 または 1.5 units/gP を添加し，常法通り蒲鉾を調製すると著しく破断強度（弾力）と凹み（コシ）が改善された蒲鉾になった。

(c)畜肉加工分野 ①ウインナーソーセージ⁽⁵⁰⁾：豚赤身挽肉 48%，豚脂 20%，食塩 1.7%，ポリリン酸塩 0.4%，亜硝酸塩 0.01%，アスコルビン酸塩 0.03%，蛋白粉末 5%，調味料・香辛料 3.5%及び水 27%の原料に対して MTG 3 units/gP 添加混合して常法通りウインナーソーセージを調製したところ，対照より明らかに高弾力性の食感が得られた。

②肉シート状食品⁽⁵¹⁾：4～5 cm 角の牛トリミング屑肉にポリリン酸塩 5%，食塩 3%，卵白などのタンパク 10%などからなるピクル液を肉に対し 20%程度インジェクションし，タンブラーで 5°C で約 4 時間マッサージした。その肉 1 kg あたり 150 units の MTG を添加しサイレントカッターで肉糊とし，2 mm 程度の厚さに伸ばして 5°C，20 時間程度保持し牛肉シート状食品を得た。これは他畜肉および魚肉にも同様に適用可能であり，巻物料理素材として好適であった。

(d)ゼラチン加工分野 フカヒレ類似食品⁽⁵²⁾：これはゼラチンを MTG 処理して調製したゲルは耐熱性を有するという特性を応用したものである。すなわち酸性法で調製したゼラチン水溶液（25%）を中和し MTG を 1 unit/gP 添加後，減圧脱気し溶液に粘りがでてから直径 1.2 mm の孔をもつノズルから 10°C に冷却された回転ドラムの側面に押し出した。この糸状ゲルを連続的に 15°C の乾燥空気室に導き，多段ロールによって表面を乾燥してから冷却ドラムに巻き取った。このものを 50°C で乾燥後切断し，7 cm 余りのものを数本ずつ束ねて 2 本の板状ヒーターの間で延伸し，最終的には 80°C で乾燥した。この食品の特長としては，Fig.5 に示したように 20 分間煮沸しても型崩れせずフカヒレ類似食品として十分な耐熱性を有するものであった。

(e)食品接着分野 成形牛肉^(53,54)：牛バラ肉の小片（約 5 cm）1 kg に MTG 1.5 units/gP 加え約 5°C で 1 時間放置することにより，チルド牛合わせ肉（ステーキ肉）を試作した。このものはフライパン上でグリルしても分離することなくかつソフトな歯ごたえとジューシー感を有していた。Fig.6 に示したように豚肉についても同様に接着でき，また魚の切り身同士の接着にも有効であった。

食品加工では，この他にも種々の用途開発がなされ数多くの特許が出願公開されているが，ここではこれ以上の紹介は割愛したい。しかし，TG は Fig.7 にもあ

Fig.5. Application of MTG-treated Gelatin to Artificial Sharks Fins (Chinese Cuisine Materials) Processing.

N1 : natural sharks fins before cooking,

N2 : natural sharks fins after cooking,

A1 : artificial sharks fins made from MTG-treated gelatin before cooking,

A2 : artificial sharks fins made from MTG-treated gelatin after cooking.

るよう加工食品のみならず多くの分野での用途が考えられ, その実用開発の進展が待たれる。

このように食品加工面で広範な利用が確認されたので, 入念な安全性等の確認後, その酵素製剤(商標名「アクティバ」)を平成5年4月に発売開始した。現在, 多くの需要家に評価され, 市場への導入に成功することが出来た。

最後に, 本研究の成果は主に味の素(株)および天野製薬(株)の研究開発部門の多数の研究技術者の協力によって

Fig.6. Restructuring of Raw Pork Meat Blocks by MTG.

Control : non-treated pork meat by MTG,

+MTG : MTG-treated pork meat.

達成されたものである。さらに千葉英雄京都大学名誉教授, 京都大学佐々木隆造教授, 京都工芸繊維大学伊倉宏司助教授には終始ご助言・ご鞭撻を賜りました。そして大阪大学蛋白質研究所下西康嗣教授には構造決定で格段のご指導を賜りました。また食品業界を中心とした各社の多くの研究者からは企業の枠を超えての暖かいご支援を賜ることができ, 勇気づけられました。以上, この場を借りて衷心よりお礼を申し上げます。

(1) J.R. Whitaker : "Food Proteins-Improvement through Chemical and Enzymatic Modification", Am. Chem. Soc, Washington

Fig.7. Examples of Future Applications of (Microbial) TG.

- DC., p 160, 1977.
- (2) M. Motoki and N. Nio : *J. Food Sci.*, **48**, 561—566 (1983).
 - (3) M. Motoki, Nio, and K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1257—1261 (1984).
 - (4) N. Nio, M. Motoki, and K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2283—2286 (1985).
 - (5) N. Nio, M. Motoki, and K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 851—855 (1986).
 - (6) N. Nio, M. Motoki, and K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1409—1412 (1986).
 - (7) M. Motoki, K. Seguro, N. Nio and K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 3025—3030 (1986).
 - (8) M. Motoki, N. Nio, K. Takinami : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 237—239 (1987).
 - (9) M. Motoki, H. Aso, K. Seguro, and N. Nio : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 993—996 (1987).
 - (10) M. Motoki, H. Aso, K. Seguro, and N. Nio : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 997—1002 (1987).
 - (11) 本木正雄 : 農化, **61**, 486—488 (1987).
 - (12) 本木正雄 : 「プロテインエンジニアリング」CMC 出版, pp 327—340 (1985).
 - (13) 丹尾式希, 本木正雄 : 「食品の物性, 第 11 集」山野, 松本編, 食品資材研究会刊, pp 85—95 (1985).
 - (14) 本木正雄 : 第 1 回コロイド・界面技術シンポジウム講演要旨集, pp 36—43 (1985).
 - (15) I. Kimura, M. Sugimoto, K. Toyoda, N. Seki, K. Arai, and T. Fujita : *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 1389—1396 (1991).
 - (16) Y. Kumazawa, K. Seguro, M. Takamura and M. Motoki : *J. Food Sci.*, **58**, 1086—1089 (1993).
 - (17) K. Ikura, T. Nasu, H. Yokota, Y. Tsuchiya, R. Sasaki, and H. Chiba : *Biochemistry*, **27**, 2898—2905 (1988).
 - (18) H. Ando, M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka, and M. Motoki : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613—2617 (1989).
 - (19) K. Washizu, K. Ando, S. Koikeda, S. Hirose, A. Matsuura, H. Takagi, M. Motoki, and K. Takeuchi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 82—87 (1994).
 - (20) T. Kanaji, H. Ozaki, T. Takao, H. Kawajiri, H. Ide, M. Motoki, and Y. Shimonishi : *J. Biol. Chem.*, **268**, 11565—11572 (1993).
 - (21) S. Takehana, K. Washizu, K. Ando, S. Koikeda, K. Takeuchi, H. Matsui, M. Motoki, and H. Takagi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 88—92 (1994).
 - (22) 本木正雄, 高木博史 : バイオサイエンスとインダストリー, **52**, 554—561 (1994).
 - (23) M. Nonaka, H. Tanaka, A. Okiyama, M. Motoki, H. Ando, K. Umeda, and A. Matsuura : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2619—2623 (1989).
 - (24) M. Nonaka, H. Sakamoto, S. Toiguchi, H. Kawajiri, T. Soeda, and M. Motoki : *J. Food Sci.*, **57**, 1214—1218 (1992).
 - (25) H. Sakamoto, M. Nonaka, and M. Motoki : *Food Hydrocolloids*, **8**, 383—386 (1994).
 - (26) Y. Kamata, E. Ishikawa, and M. Motoki : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1323—1324 (1992).
 - (27) Y—P. Huang, K. Seguro, M. Motoki, and K. Tawada : *J. Biochem.*, **112**, 229—234 (1992).
 - (28) 田中晴生, 野中雅彦, 本木正雄 : 日水誌, **56**, 1341 (1990).
 - (29) M. Nonaka, S. Toiguchi, H. Sakamoto, H. Kawajiri, T. Soeda, and M. Motoki : *Food Hydrocolloids*, **8**, 1—8 (1994).
 - (30) I. Kang, Y. Matsumura, K. Ikura, M. Motoki, H. Sakamoto, and T. Mori : *J. Agr. Food Chem.*, **42**, 159—165 (1994).
 - (31) H. Sakamoto, Y. Kumazawa, and M. Motoki : *J. Food Sci.*, **59**, 866—871 (1994).
 - (32) K. Ikura, R. Sasaki, and M. Motoki : *Comments Agric. & Food Chemistry*, **2**, 389—407 (1992).
 - (33) A. Kato, T. Wada, K. Kobayashi, K. Seguro and M. Motoki : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1027—1031 (1991).
 - (34) 野中雅彦, 松浦幸宏, 本木正雄 : 日本食品工業学会第 41 回大会講演要旨集 p 32 (1994).
 - (35) K. Ikura, M. Yoshikawa, R. Sasaki, and H. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2587—2592 (1981).
 - (36) K. Ikura, K. Okumura, M. Yoshikawa, R. Sasaki, and H. Chiba : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1877—1878 (1985).
 - (37) 野中雅彦, 松浦幸宏, 本木正雄 : 日本農芸化学会 1994 年度大会講演要旨集 p 152 (1994).
 - (38) 三輪治文 : 月刊フードケミカル 7 月号, pp 38—42 (1987).
 - (39) 本木正雄, 梅田幸一 : 「水産加工とタンパク質の変性制御(水産学シリーズ 84)」新井編, 恒星社厚生閣刊, pp 56—64 (1991).
 - (40) M. Motoki and K. Seguro : *Inform.*, **5**, 308—313 (1994).
 - (41) 本木正雄 : 油化学, **41**, 217—222 (1992).
 - (42) 本木正雄 : 「食品ハイドロコロイド」, 矢野, 西成編, 朝倉書店, pp 235—248 (1990).

- (43) 添田孝彦: 月刊フードケミカル 3 月号, pp 108—113 (1992).
 - (44) 添田孝彦: 食品工業, **36** (12), 67—72 (1992).
 - (45) 添田孝彦, 山崎勝利, 坂口正二: 食品と科学 8 月号, pp 95—99 (1993).
 - (46) 日本特許: 特開平 02—69155.
 - (47) 日本特許: 特開平 02—286054.
 - (48) 日本特許: 特開平 02—100653.
 - (49) 日本特許: 特開平 04—267219.
 - (50) 日本特許: 特開平 04—267220.
 - (51) 日本特許: 特開平 03—232478.
 - (52) 日本特許: 特開平 02—171160.
 - (53) 日本特許: 特開平 02—79956.
 - (54) 日本特許: 特開平 04—141693.
 - (55) 添田孝彦, 石井智穂, 山崎勝利, 村瀬和良: 食品科工誌, **42**, 254—261 (1995).
-